Gouvernement du Canada
Government of Canada

Service canadien des forêts
Canadian Forestry Service

Production et évaluation de *Beauveria bassiana* pour la lutte contre les insectes s'attaquant aux cônes et aux semences de l'épinette blanche

W.H. Fogal, R.K. Mittal et G.S. Thurston

Rapport d'information PI-X-69F
Institut forestier national de Petawawa

87-05654/

INSTITUT FORESTIER NATIONAL DE PETAWAWA

Le mandat de l'Institut forestier national de Petawawa, comme celui des autres établissements du Service canadien des forêts, est de promouvoir une meilleure gestion et une utilisation plus rationnelle des ressources forestières du Canada, pour le bien économique et social de tous les Canadiens. Les objectifs des activités des programmes menés à l'institut appuient ce mandat à travers la découverte, le développement, la démonstration, l'application et le transfert des innovations. En tant qu'institut national, il doit s'attacher à des problèmes qui débordent le cadre régional ou qui nécessistent des compétences particulières de même qu'un équipement non disponible aux installations régionales du Service canadien des forêts. La plupart du temps, ses recherches sont effectuées en étroite collaboration avec le personnel des centres régionaux ou des services forestiers des provinces. Les projets de recherche et les services techniques de l'institut sont regroupés sous six principales activités:

GÉNÉTIQUE FORESTIÈRE ET BIOTECHNOLOGIE - Ce programme encadre des projets sur la génétique forestière, la microbiologie, la micropropagation, la génétique moléculaire et la recherche sur les semences. Il comprend également les services à la clientèle et la banque de semences du Centre national de semences forestières. Ce centre existe depuis longtemps et est lié à plusieurs organismes internationaux.

SYSTÈMES D'AMÉNAGEMENT FORESTIER - Ce programme intègre en recherche et développement, des projets sur les incendies de forêt, la télédétection, la météorologie, la modélisation, la croissance et la récolte, et le RIMA. Il permet ainsi l'élaboration et la démonstration de systèmes d'aménagement forestier.

STATISTIQUES NATIONALES SUR LA RESSOURCE FORESTIÈRE - Communément appelé FORSTATS, ce programme assure la coordination de l'acquisition, de la normalisation et de la publication de statistiques nationales sur les forêts du Canada. Il est aussi chargé de répondre aux demandes de renseignements de la clientèle.

SYSTÈMES DE DONNÉES FORESTIÈRES - Ce programme fournit la compétence et les systèmes informatisés nécessaires à la gestion des données acquises dans le cadre de FORSTATS et des projets de recherche à l'IFNP. Il comprend en outre un service de consultation en informatique pour les hauts fonctionnaires du SCF.

COMMUNICATIONS - Ce programme regroupe les activités de la bibliothèque et des projets touchant la sensibilisation du public, l'information, la rédaction-révision et les publications. L'institut reçoit plus de 20 000 visiteurs chaque année. Le Centre d'accueil, des visites autoguidées et un programme éducatif complet sont ouverts à tous. C'est à l'IFNP que l'on trouve l'entrepôt national de toutes les publications scientifiques du SCF.

LA FORÊT EXPÉRIMENTALE - Outre des peuplements naturels où l'on applique divers traitements dans le cadre de projets de recherche en sylviculture, la Forêt de Petawawa, mesurant 98 km^2, comprend de vastes superficies de plantations âgées de plus de 60 ans. Ces plantations expérimentales permettent d'obtenir des données sur la croissance et la récolte à la suite d'expériences de culture. Elles fournissent du matériel génétique dont le lignage est répertorié, et se révèlent de plus en plus utiles pour les études sur la micropropagation et la génétique moléculaire. La forêt permet également de mettre à l'essai des stratégies d'aménagement forestier à court et à long terme.

COUVERTURE: *Beauveria bassiana*: hyphes aériens, cellules produisant des spores, et conidiospores (5 microns à l'échelle).

PRODUCTION ET ÉVALUATION DE *BEAUVERIA BASSIANA* POUR LA LUTTE CONTRE LES INSECTES S'ATTAQUANT AUX CÔNES ET AUX SEMENCES DE L'ÉPINETTE BLANCHE

Rapport d'information PI-X-69F

W.H. Fogal, R.K. Mittal[1] et G.S. Thurston[2]

Institut forestier national de Petawawa
Service canadien des forêts
Chalk River (Ontario)

1987

[1]Boursier-recherche scientifique du CRSNG
[2]Département d'entomologie, Collège Macdonald, Université McGill
21 111, chemin Bord-du-lac
Sainte-Anne-de-Bellevue (Québec) H9X 1C0

©Ministre des Approvisionnements et Services Canada, 1986
N° de catalogue Fo46-11/69-1987F
ISSN 0228-0736
ISBN 0-662-94267-1

Des exemplaires de cette publication peuvent être obtenus à l'adresse suivante:

Centre d'information technique et de distribution
Institut forestier national de Petawawa
Chalk River (Ontario)
K0J 1J0

N° de téléphone: 613-589-2880

This publication is also available in English under the title **Production and evaluation of *Beauveria bassiana* for control of white spruce cone and seed insects.**

Table des matières

v Résumé/Abstract

1 Introduction

2 Production de conidiospores

3 a) Préparation du son
3 b) Préparation de l'inoculum
5 c) Inoculation du son
5 d) Incubation
5 e) Récolte
6 f) Entreposage
6 g) Mesures de sécurité

6 Évaluation de la qualité des conidiospores

7 a) Nombre de conidiospores
7 b) Nombre de conidiospores viables
7 c) Pouvoir pathogène

9 Possibilités d'utilisation contre les insectes s'attaquant aux cônes et aux semences

11 Références

14 Remerciements

16 Annexe I
17 Annexe II
17 Annexe III

Figures

2 1. Larves de A) la mouche granivore de l'épinette, Lasiomma anthracina (Czerny), et B) la tordeuse des graines de l'épinette, Cydia youngana (Kearfott), envahies par Beauveria bassiana (Bals.) Vuill.

4 2. A) Colonies de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. en croissance sur une plaque de gélose-pommes de terre-dextrose (GPD); et B) conidiospores dans une cellule de numération.

10 3. A) Saupoudrage de conidiospores de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. sur des strobiles d'épinette blanche, Picea glauca (Moench) Voss, pour la protection des semences; et B) boîtes de sol destinées à des essais biologiques visant à contrôler l'efficacité de B. bassiana contre la mouche granivore de l'épinette, Lasiomma anthracina (Czerny).

Avertissement: La mention dans ce rapport de marques de commerce et de noms d'entreprises ne vise qu'à informer le lecteur. Elle ne signifie pas qu'Agriculture Canada, le Service canadien des forêts, l'Institut forestier national de Petawawa ou les auteurs cautionnent ou approuvent l'utilisation des produits ou des services en question à l'exclusion de tout autre.

Attention: Le lecteur est prié de s'informer auprès des hygiénistes et des agents chargés de la répression des insectes ravageurs des gouvernements provinciaux et fédéral au sujet des règlements touchant la production et l'utilisation d'insecticides biologiques.

RÉSUMÉ

Ce rapport décrit en détail une méthode de production, sur du son, des conidies de champignons pathogènes pour les insectes, en l'occurence Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. Il énonce les modalités pour déterminer et maintenir la viabilité des spores et garantir au produit un degré élevé de virulence contre les insectes ravageurs. On y mentionne des possibilités d'utilisation contre les insectes s'attaquant aux cônes et aux semences de l'épinette blanche (Picea glauca [Moench] Voss).

ABSTRACT

This report provides a detailed description of a method for producing conidiospores of entomopathogenic fungi, exemplified by Beauveria bassiana (Bals.) Vuill., on a bran medium. Procedures are outlined for determining and maintaining viability of spores and ensuring that the product has a high degree of virulence against insect pests. Possible modes of application for use against white spruce Picea glauca (Moench) Voss cone and seed insects are suggested.

PRODUCTION ET ÉVALUATION DE BEAUVERIA BASSIANA POUR LA LUTTE CONTRE LES INSECTES S'ATTAQUANT AUX CÔNES ET AUX SEMENCES DE L'ÉPINETTE BLANCHE

INTRODUCTION

Les cônes et les semences de conifères, y compris l'épinette blanche, Picea glauca (Moench) Voss, sont attaqués et détruits par de nombreuses espèces d'insectes (Hedlin et al., 1980; Sterner et Davidson, 1983; Tripp et Hedlin, 1956; Werner, 1964). Il est possible de lutter contre les insectes ravageurs de l'épinette blanche à l'aide d'insecticides systémiques appliqués par pulvérisation sur le feuillage (Hedlin, 1973; Fogal et Lopushanski, 1985) ou par injection de la tige et par des implants (Fogal et Lopushanski, 1984). Toutefois, les résultats des traitements n'ont pas toujours été probants; les traitements peuvent causer le stress phytotoxique des arbres, et les substances chimiques employées peuvent être dangereuses pour l'homme et la faune. Ces effets négatifs sur l'environnement, et le fait que les insectes développent une résistance aux insecticides chimiques, ont incité des chercheurs à trouver des agents microbiologiques pour la répression des insectes qui s'attaquent aux arbres forestiers (Franz, 1970, 1971). Différents microorganismes, dont des bactéries, des virus, des champignons et des protozoaires, peuvent causer des maladies infectieuses chez ces insectes. L'utilisation de bactéries et de virus a permis de lutter efficacement contre des insectes défoliateurs, mais moins d'attention a été accordée aux champignons et aux protozoaires car leur efficacité était moindre (Coppell et Mertins, 1977; Morris et al., 1986). Pourtant, deux espèces de champignons sont considérées comme prometteuses pour la répression des insectes ravageurs: Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. et Metarrhizium anisopliae (Metch.) Sor. (Coppell et Mertins, 1977; Dunn et Mechalas, 1963; Roberts, 1973).

Des champignons entomopathogènes, B. bassiana et M. anisopliae, ont été choisis pour la lutte biologique éventuelle contre les insectes s'attaquant aux cônes et aux semences de l'épinette blanche parce qu'il a été démontré qu'ils étaient très efficaces contre Chortophila laricicola (Karl) et la pyrale des cônes du mélèze, Dioryctria abietella (Schiff) (Tyul'panova et al., 1975). De plus, il a été démontré que plusieurs insectes se nourrissant des cônes et des semences de l'épinette blanche sont vulnérables à l'action de ces deux champignons (Timonin et al., 1980). La figure 1 montre deux des insectes les plus dévastateurs, la mouche granivore de l'épinette, Lasiomma anthracina (Czerny), et la tordeuse des graines de l'épinette, Cydia youngana (Kearfott), envahis par B. bassiana. Tant sur le terrain qu'en laboratoire, ces champignons ont permis de réduire des populations de plusieurs espèces d'insectes ravageurs (annexe I). Le recours à d'autres espèces de champignons pourrait être considéré (Roberts et Humber, 1981).

La réussite des essais sur le terrain visant à démontrer l'efficacité de champignons pour la répression d'insectes ravageurs dépend de divers facteurs: la vulnérabilité des insectes à l'action des champignons en présence, la virulence de l'agent pathogène, des facteurs environnementaux et la quantité d'inoculum appliquée. Selon McCoy et Carver (1941), le taux de réussite pourrait être accru par l'augmentation des quantités de spores

A B

Figure 1. Larves de A) la mouche granivore de l'épinette, Lasiomma anthracina (Czerny), et B) la tordeuse des graines de l'épinette, Cydia youngana (Kearfott), envahies par Beauveria bassiana (Bals.) Vuill.

appliquées et de la superficie de la zone traitée. Pour ce faire, il faut disposer d'un approvisionnement continu de grandes quantités d'inoculum très virulent à l'endroit des insectes en cause. L'inoculum peut être obtenu en grandes quantités de fournisseurs commerciaux[1], mais on ne connaît ni sa qualité ni sa virulence contre les insectes qui s'attaquent aux cônes et aux semences de l'épinette blanche. L'objet du présent rapport est de décrire en détail une méthode de production de conidiospores dont l'efficacité contre ces insectes est connue, et de veiller à ce que le produit fabriqué ou obtenu ailleurs ait un degré élevé de virulence à l'endroit des insectes ravageurs à l'étude. Ce document se veut un guide et un répertoire d'ouvrages choisis pour la production de Beauveria bassiana (Moench) Voss.

PRODUCTION DE CONIDIOSPORES

Des spores de champignons entomopathogènes comme B. bassiana peuvent être produits dans des milieux solides ou liquides dans des conditions de stérilité complète ou partielle (Pristavko et Goral, 1967; Roberts et Yendol, 1971; Roberts et Humber, 1981; Samsinakova et al., 1981). Dans des milieux de culture liquides, le champignon produit des blastospores ayant une vie plus courte que les conidiospores produits dans des milieux solides (Pristavko et

[1] Laboratoires Abbott, Division des produits chimiques et agricoles, 173, chemin Oakwood, Long Grove (ILL), Etats-Unis, 60047.

Goral, 1967). On peut produire des conidiospores dans un milieu solide en mettant le champignon en culture sur des substrats en vrac comme du son, des grains ronds, des pommes de terre, du foin, de la paille, etc. placés dans des flacons, des bouteilles ou des bacs.

La méthode de production de conidiospores décrite ici est adaptée de celle de McCoy et Carver (1941), et elle a servi à produire des conidiospores de B. bassiana et de M. anisopliae pour des essais en laboratoire et sur le terrain en présence d'insectes s'attaquant aux semences et aux cônes de l'épinette blanche (Timonin et al., 1980; Fogal, 1986; Fogal et al., 1986). Nous donnons dans l'annexe II une liste des fournitures et des équipements nécessaires à l'application de la méthode. Jong (1981) et Müller-Kögler (1967a) traitent en général de l'isolement, de la culture et du maintien de champignons à conidies.

a) Préparation du son

Laver le nombre voulu de ballons de Fernbach (5 à 10) avec du détergent, et rincer plusieurs fois à l'eau claire. Mettre 150 g de son de blé et 150 mL d'eau dans chaque ballon. Mélanger avec une anse rigide en fil métallique ou la poignée d'un gros goupillon en fil métallique torsadé jusqu'à ce que le milieu soit complètement humide, sans contenir de grumeaux. Fermer les ballons avec un bouchon de coton bien serré dans l'ouverture, et stériliser à l'autoclave à 121°C (103,5 kPa) pendant 30 minutes. Retirer de l'autoclave et incuber les ballons à 28°C pendant 24 heures, puis autoclaver de nouveau à 121°C (103,5 kPa) pendant 30 minutes. La chaleur produite pendant le premier traitement à l'autoclave est peut-être insuffisante pour tuer toutes les spores fongiques et bactériennes résistantes à la chaleur et à l'état de dormance, mais l'incubation durant 24 heures dans des conditions idéales (chaleur et humidité) active habituellement les microbes survivants, ce qui les rend vulnérables au second traitement à l'autoclave. Quand le contenu des ballons est refroidi à la température de la pièce, le milieu est prêt pour l'inoculation.

b) Préparation de l'inoculum

Pour l'inoculation, il faut disposer de cultures pures de B. bassiana ou de M. anisopliae. Ces cultures peuvent être obtenues d'autres chercheurs mais, étant donné l'état actuel d'avancement de la lutte biologique contre les insectes à l'aide de champignons, il vaut mieux isoler les souches qui ont un pouvoir pathogène élevé sur les insectes en question (Fargues et Robert, 1978; Timonin et al., 1980). Pour ce faire, il faudra peut-être effectuer l'isolement à partir d'un insecte mort et envahi par le champignon, ou de matériaux de sol ou de plantes adaptés à la présence des insectes visés. Comme ces sources sont contaminées par des bactéries et divers autres champignons, il faut utiliser un milieu de culture choisi qui empêche la croissance des bactéries et qui réduit le développement d'autres champignons. Un milieu de culture efficace pour ce besoin a été établi par Veen et Ferron (1966) et modifié par Doberski et Tribe (1980) pour permettre une meilleure croissance. Nous donnons à l'annexe III une recette pour la préparation de ce milieu.

Des échantillons d'insectes momifiés, de sol ou d'autres sources potentielles du champignon en question sont broyés et mélangés en une pâte, ou lavés avec de l'eau stérile contenant 0,01 % de Tween 80. Le produit est

dilué avec un volume approprié d'eau et étalé en parties aliquotes de 1 mL sur des plaques du milieu sélectif. Les plaques sont incubées à 27°C, et des colonies identifiées après une croissance de trois à cinq jours.

Sur ce milieu sélectif, on observe une bonne croissance de mycéliums aériens de couleur blanche qui se distinguent du fond violet dans les colonies de B. bassiana. Vues par en dessous, les colonies sont violet foncé, peut-être à cause de la capture sélective de colorant à partir du milieu. Observées à l'aide d'un puissant microscope, les conidiospores sont unicellulaires, hyalines, et rondes à ovoïdes. De plus, elles ont un diamètre d'environ 2 à 4 µ et sont portées individuellement par un petit stérigmate. Pour connaître les caractères taxinomiques qui distinguent B. bassiana d'autres contaminants possibles, consulter MacLeod (1954). En outre, Barron (1968), Kendrick (1971), et Kendrick et Carmichael (1973) décrivent d'autres genres d'hyphomycètes.

On obtient des colonies pures en isolant une colonie à partir d'une plaque portant un milieu mélangé. Retirer soigneusement la colonie désirée sous une hotte stérile, et l'ensemencer en stries sur une autre plaque de gélose. A ce stade, on peut utiliser une plaque standard portant gélose-pommes de terre-dextrose (GPD) (Johnston et Booth, 1983). Après plusieurs jours de croissance, quand les colonies obtenues sont identifiables, il faudra peut-être répéter ce processus s'il y a présence de contaminants. Dans le cas contraire et quand on dispose d'une boîte de Petri contenant de nombreuses colonies en sporulation, il est possible de préparer le liquide servant à l'inoculation. Le figure 2a montre des colonies en croissance sur une plaque de GPD. On peut conserver au réfrigérateur (à 4°C) pendant plusieurs mois des colonies en sporulation dans des boîtes de Petri sans que les conidiospores perdent complètement leur viabilité.

A B

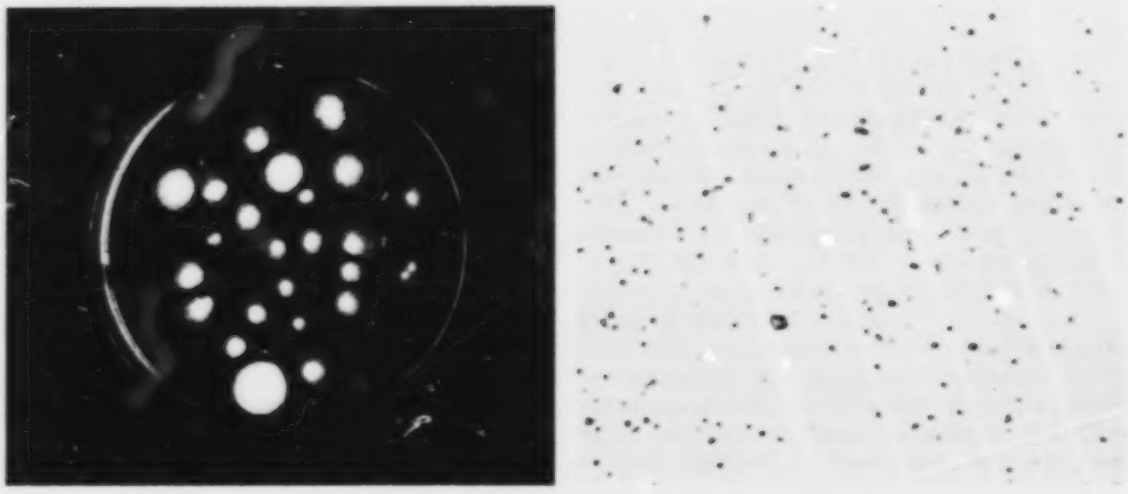

Figure 2. A) Colonies de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. en croissance sur une plaque de gélose-pommes de terre-dextrose (GPD); et B) conidiospores dans une cellule de numération.

Comme les conidiospores de B. bassiana sont hydrophobes, il faut ajouter un émulsifiant au liquide qui sert à l'inoculation. Dans un ballon d'Erlenmeyer de 1 L, mettre 500 mL d'eau du robinet et 4 ou 5 gouttes de Tween 80, bien agiter, puis mettre 100 mL du produit obtenu dans chacun des flacons à dilution à bouchon vissable (5 à 10). Visser les bouchons légèrement, et stériliser les flacons à l'autoclave à 121°C (103,5 kPa) pendant 20 minutes. Serrer les bouchons immédiatement après avoir retiré les flacons de l'autoclave. Quand les flacons sont refroidis à la température de la pièce, les conidiospores peuvent être suspendues dans le liquide. Sous une hotte stérile, à l'aide d'une grosse anse (10 mm de diamètre) passée à la flamme et refroidie, transférer le milieu de culture en sporulation, en grattant, d'une plaque de gélose à un flacon de liquide stérile refroidi. Répéter pour les autres flacons à dilution jusqu'à ce que la majorité des champignons en sporulation soient enlevés de la plaque. Passer l'ouverture de chaque flacon à la flamme, les boucher, et agiter vigoureusement pendant deux minutes pour que les conidiospores soient suspendues également.

c) Inoculation du son

À l'aide d'une pipette stérile, mettre 10 mL de la suspension obtenue dans chaque ballon de son. Ce faisant, éviter de déposer le bouchon de coton; il faut plutôt le tenir dans une main pendant qu'on verse la suspension, puis s'assurer qu'il est remis bien serré dans l'ouverture. Agiter le milieu suffisamment pour que l'inoculum soit dispersé.

Toute suspension restante peut être conservée au réfrigérateur pendant jusqu'à deux jours et utilisée pour inoculer d'autres milieux de culture et, donc, pour produire d'autres suspensions de conidiospores.

d) Incubation

Le son inoculé contenu dans les ballons est incubé à une température constante d'environ 28°C. Il faudrait agiter les ballons une fois par jour pour empêcher l'aggrégation excessive de leur contenu. Une certaine aggrégation est admissible, mais si elle est exagérée, les rendements en conidiospores seront réduits car la sporulation ne pourra se faire que sur une surface réduite.

e) Récolte

Les champignons peuvent être récoltés après une période de 6 à 10 jours, quand le son est complètement envahi de mycéliums blancs et quand les conidiospores adhèrent aux parois des ballons durant l'agitation. Pour accroître la production et le dégagement de conidiospores, il faut faire sécher le milieu de culture. Le séchage des milieux de culture en vue de produire une sporulation appropriée devrait avoir lieu peu de temps après qu'on constate que la croissance des mycéliums est adéquate. Cette précaution permet de prévenir la diminution de la germination en pourcentage des conidiospores obtenues (Müller-Kögler, 1967a). On fait sécher les milieux de culture en épandant le contenu des ballons sur des serviettes en papier placées dans des bacs en métal ou en verre, et en broyant les gros grumeaux. Quand les milieux de culture sont épandus également, il faudrait les couvrir d'autres serviettes de papier, et les placer dans un four de séchage bien ventilé à 35°C jusqu'à ce

que le mélange son-champignons soit sec (le séchage doit généralement durer trois jours).

Quand le mélange est assez sec pour s'effriter très facilement entre les doigts, les conidiospores peuvent être séparées du son et des mycéliums fongiques par tamisage. Un tamis de sol à maille de 1,00, 0,50 ou 0,044 mm monté sur un agitateur à mouvement de va-et-vient donne de bons résultats. Pour le tamisage et la manutention des conidiospores, il faut toujours porter un masque antipoussière, des gants, et un sarrau ou une combinaison pour éviter les allergies que la poussière peut causer.

Au terme de notre expérience, 150 g de son a produit une préparation de 6 à 12 g contenant environ 7,5 à 9,5 x 10^9 de conidiospores par milligramme (Timonin et al., 1980).

f) Entreposage

Les conidiospores de B. bassiana devraient être conservées à un taux d'humidité minimal, dans l'obscurité et à 4°C (Müller-Kögler, 1967a). Dans ces conditions, elles demeurent viables pendant plusieurs années. Clerk et Madelin (1965) ont constaté que la lumière et l'humidité réduisent la longévité des conidiospores; 90 % des conidiospores de B. bassiana étaient viables au-delà de 635 jours après entreposage à 8°C dans l'obscurité et dans une atmosphère sèche. Kral et Neubauer (1956) ont conservé des conidiospores dans des ballons munis de bouchons en verre dépoli à la température ambiante (18 à 22°C) et à un taux d'humidité relative de 65 à 75 %. La capacité germinative des conidiospores n'avait pas diminué après 560 jours, mais la vitesse de germination avait diminué dans le cas des spores d'aulne. Pour éviter que les conidiospores perdent leur viabilité, il est souhaitable que les préparations soient utilisées durant l'année suivant la récolte.

g) Mesures de sécurité

Il est généralement admis que les champignons entomopathogènes ne causent pas de mycoses chez l'homme ou chez d'autres organismes homéothermes (Roberts et Humber, 1981). Toutefois, on a signalé que le contact avec de la poussière de conidiospores cause des allergies (Hall, 1954; Heimpel, 1971; Müller-Kögler, 1967a; York, 1958). Parmi les symptômes observés, on retrouve des maux de tête, des douleurs aux extrémités, des refroidissements, puis de la fièvre et une forte transpiration. Il faudrait se servir de hottes de confinement pour traiter des conidiospores de B. bassiana et d'autres espèces de champignons. Pour réduire le risque d'exposition, il faudrait aussi porter un masque antipoussière, des gants de caoutchouc et un sarrau à manches longues.

ÉVALUATION DE LA QUALITÉ DES CONIDIOSPORES

La qualité des conidiospores obtenus dépend de plusieurs facteurs: le nombre de conidiospores par rapport à la quantité de mycéliums et de particules de son dans le produit, la viabilité des conidiospores et la virulence de l'isolat mis en culture.

a) Nombre de conidiospores

On détermine le nombre de conidiospores contenues dans une préparation à l'aide d'un hémacytomètre. Celles-ci forment souvent des agrégats qui doivent être désagrégés pour la numération. Pour ce faire, ajouter une goutte de Tween 80 à 50 mL d'eau distillée et bien agiter; ensuite, ajouter à cette solution 50 mg de la préparation de conidiospores, puis agiter ou homogénéiser pendant 15 minutes pour disperser les conidiospores. On colore les conidiospores pour en faciliter la numération en mélangeant des quantités égales de suspension et de bleu coton à 0,1 % dans du lactophénol (figure 2a). Il faudrait produire au moins trois suspensions à partir de chaque préparation et faire quatre numérations des conidiospores contenues dans chaque suspension.

b) Nombre de conidiospores viables

On compte le nombre de conidiospores viables dans le produit récolté en mettant des dilutions sériales sur des plaques de GPD. Pour désagréger les aggrégats de conidiospores et de conidiospores-mycéliums, on mélange soigneusement la préparation, et on la tamise à plusieurs reprises avec de la farine de blé stérilisée. La dose de 100 mg de préparation de conidiospores par 50 g de farine de blé donne des résultats satisfaisants. Peser 100 mg du mélange conidiospores-farine, et mettre-le dans un ballon à dilution contenant 100 mL d'eau stérile et deux gouttes de Tween 80. Bien agiter le ballon pendant cinq minutes pour réduire au minimum l'aggrégation des conidiospores et pour distribuer celles-ci également. Pipetter 10 mL de cette suspension dans un autre ballon à dilution contenant 90 mL d'eau et une goutte de Tween 80, et bien agiter pendant deux minutes pour disperser les conidiospores. Répéter ce procédé de dilution plusieurs fois, ce qui permet de déterminer par tâtonnement le facteur de dilution désiré. Dans notre laboratoire, la dilution de la suspension de 1/10 à 1/1000 a donné des résultats satisfaisants. À partir de chaque dilution, pipetter avec précision 0,1, 0,2 et 0,3 mL sur les plaques de GPD, et étendre la goutte avec le bord d'une lame en verre stérile de microscope. Soixante-douze heures plus tard, des colonies du champignon devraient être visibles sur les plaques. Comme il peut s'y trouver des contaminants, il faut s'assurer, avant la numération, que les colonies sont bien des colonies de B. bassiana. Il est supposé que chaque colonie représente une conidiospore distincte; par conséquent, on peut calculer le nombre de conidiospores par milligramme simplement en comptant le nombre de colonies par plaque et en refaisant le calcul dans la série de dilutions. Les plaques qui portent 10 à 50 colonies distinctes donnent les résultats les plus précis. Il faudrait compter au moins cinq plaques pour chaque dilution (figure 2b).

c) Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène est déterminé par la virulence de l'isolat utilisé et par la vulnérabilité de l'insecte. Différentes souches de la plupart des champignons peuvent avoir un taux de croissance et une forme différents ainsi que différents degrés de virulence à l'endroit d'un insecte donné. Par exemple, Doberski (1981) a constaté qu'il fallait 5,6 à 10,3 jours pour causer un taux de mortalité de 50 % chez Scolytus scolytus F., selon la souche de B. bassiana utilisée. Zaccharuk et Tinline (1968), qui ont utilisé une souche de M. anisopliae, ont obtenu un taux de mortalité de 2 à 100 % chez quatre espèces différentes de vers fil-de-fer. Ces variations de la virulence selon les souches d'espèces de champignons, et de la vulnérabilité des insectes

selon l'espèce, pourraient faire la différence entre l'échec et la réussite d'un programme d'application du champignon. En conséquence, il faudrait choisir, dans la mesure du possible, la souche qui possède le plus grand degré de virulence à l'endroit de l'insecte cible. Si l'on dispose d'une seule souche, on peut en augmenter la virulence en la faisant pousser plusieurs générations sur l'insecte hôte. Fargues et Robert (1978) ont découvert que le simple fait de faire pousser le champignon sur une espèce d'insecte augmente sa virulence envers l'insecte en question chaque fois que le champignon est <<passé au travers>> de l'hôte. Depuis, Timonin et al. (1980) ont montré cet effet sur les insectes s'attaquant aux cônes et aux semences. Toutefois, cet accroissement de la virulence n'a encore trouvé aucune explication. On peut faire diminuer la virulence de la souche par repiquages successifs sur des milieux artificiels, puis l'accroître de nouveau en l'appliquant à un insecte hôte approprié (Roberts et Yendol, 1971). Cette souplesse porte à croire qu'un essai en présence de l'insecte ou des insectes à combattre devrait être obligatoire avant qu'on entreprenne des expériences ou des campagnes de répression à grande échelle, de manière que les doses ou les taux d'application puissent être réglés en conséquence.

Dans la mesure du possible, le pouvoir pathogène de tous les lots de spores produits devrait être vérifié sur l'insecte cible utilisé pour l'essai biologique. Toutefois, cette vérification est souvent impossible ou peu pratique car il est très difficile d'élever certaines espèces d'insectes en laboratoire tandis que d'autres ne peuvent être obtenues qu'à certaines époques de l'année. On peut utiliser une espèce d'insectes apparentée pour les besoins de la cause. On peut faire une évaluation simple du pouvoir pathogène du champignon en plongeant l'insecte dans une suspension contenant une quantité connue de spores, en le saupoudrant avec des spores sèches dans une assiette peu profonde ou en le badigeonnant à l'aide d'un pinceau à poils de chameau portant des spores. L'insecte traité devrait ensuite être placé dans un milieu très humide, par exemple sur un papier filtre mouillé dans une boîte de Petri. On évalue chaque jour le taux de mortalité des insectes attribuable au champignon ou à d'autres causes. Il est possible de faire varier la dose appliquée aux insectes en diluant la suspension contenant des spores avec des quantités connues d'eau, ou en mélangeant des spores sèches avec des volumes connus d'une poussière inerte comme du talc ou de la farine. Pour le traitement d'insectes qui s'attaquent aux aliments entreposés, on peut mélanger les spores, en différentes quantités, avec les aliments attaqués (Steinhaus et Bell, 1953); on peut faire des essais avec des insectes pédicoles en mélangeant les spores avec le sol en question (Zacharuk et Tinline, 1968; Fogal, 1986). Les insectes qui se nourrissent des feuilles de plantes en pots peuvent être saupoudrés de suspensions de conidiospores contenues dans une tour de vaporisation (Burgerjon, 1956).

Ces méthodes peuvent servir à obtenir une concentration de spores fongiques suffisante pour causer la mort d'une certaine quantité d'insectes cobayes (DL_{50} ou DL_{90} ou les deux), ou à obtenir l'intervalle nécessaire pour causer la mort d'une certaine quantité de ces insectes à une dose donnée (TL_{50} ou TL_{90} ou les deux). Pour déterminer avec précision les DL_{50} ou les TL_{50}, il faut avoir recours aux analyses appropriées par la méthode des probits (Finney, 1971). Si la masse des données est imposante, un programme informatique peut être utilisé (Robertson et al., 1980).

POSSIBILITÉS D'UTILISATION CONTRE LES INSECTES S'ATTAQUANT AUX CÔNES ET AUX SEMENCES

Il existe essentiellement deux méthodes d'utilisation d'agents microbiens pour la répression d'insectes ravageurs. L'une consiste à introduire un agent de répression exotique en espérant qu'il réussira à s'implanter, à se multiplier et à lutter efficacement contre les insectes cibles. Cette méthode a porté fruit contre des insectes qui avaient été introduits à un endroit et qui y avaient fait des ravages parce qu'ils n'avaient aucun ennemi dans leur nouvel habitat. Un exemple classique de l'application de cette méthode est la répression du diprion européen de l'épinette, Gilpinia hercyniae Htg., dans l'est du Canada au moyen d'un virus nucléaire de polyhidrose (Neilson et Morris, 1964). La seconde méthode implique la pulvérisation abondante des ravageurs; il s'agit essentiellement d'appliquer une préparation microbienne à la manière d'un pesticide chimique. De grandes quantités d'un agent microbien peuvent être appliquées dans une région où celui-ci peut déjà exister, mais en concentrations insuffisantes pour agir sur les insectes. Cette dernière méthode peut s'appliquer à l'utilisation de B. bassiana pour la lutte contre les insectes s'attaquant aux cônes et aux semences de l'épinette.

D'après les connaissances actuelles du cycle biologique des insectes qui s'attaquent aux cônes et aux semences de l'épinette (Hedlin et al., 1980; Tripp et Hedlin, 1956), l'application de conidies peut se faire par différentes méthodes et à différentes époques de l'année. Par exemple, on peut vaporiser ou saupoudrer les cimes des arbres avec des conidiospores avant la floraison de manière à infecter les larves des tordeuses des bourgeons de l'épinette, Choristoneura fumiferana (Clem), et des pyrales des cônes de l'épinette, Dioryctria reniculelloïdes (Mutuura et Munro), avant que ces insectes commencent à se nourrir des fleurs. Une autre méthode consiste à saupoudrer le sol et la litière autour de la base des arbres pour infecter les spécimens adultes d'insectes comme la mouche granivore de l'épinette, Lasiomma anthracina (Czerny), à mesure qu'ils sortent du sol, et la tordeuse des graines de l'épinette, Cydia youngana (Kearfott), à mesure qu'ils émergent des cônes dans la litière au moment de la floraison. Il peut être avantageux de vaporiser ou de saupoudrer les strobiles des cimes des arbres au moment où les adultes de plusieurs espèces d'insectes déposent leurs oeufs sur les cônelets. On peut vaporiser et saupoudrer les cimes au début de l'été en vue d'infecter les spécimens de ces deux espèces rendus à des stades plus avancés. On peut également saupoudrer le sol au début de l'été pour infecter les larves des pyrales des cônes à mesure qu'elles émergent des cônes et tombent dans la litière pour hiverner.

Deux de ces méthodes ont été éprouvées en laboratoire et au cours d'essais de petite échelle sur le terrain. Les strobiles d'épinettes blanches ont été saupoudrés de conidiospores juste après la pollinisation, au moment où des insectes comme la pyrale des cônes et la tordeuse des graines pondent leurs oeufs (figure 3a). L'essai a produit une augmentation de 55 % du nombre de graines saines, ce qui porte à croire que les insectes ont été tués par le champignon et que ces traitements peuvent prévenir les pertes de graines (Fogal et al., 1986). Toutefois, des facteurs climatiques comme les pluies et l'insolation peuvent influer sur le taux d'infection et sur la viabilité des conidiospores. Au cours du second essai, on a saupoudré le sol d'une préparation contenant $8,5 \times 10^{10}$ conidiospores par gramme pour la répression de la mouche granivore de l'épinette. Des études en laboratoire et des simulations

A B

Figure 3. A) Saupoudrage de conidiospores de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. sur des strobiles d'épinette blanche, Picea glauca (Moench) Voss, pour la protection des semences; et B) boîtes de sol destinées à des essais biologiques visant à contrôler l'efficacité de B. bassiana contre la mouche granivore de l'épinette, Lasiomma anthracina (Czerny).

(figure 3b) ont révélé qu'un mélange de ces conidiospores et de farine de blé ou de talc, mélangé avec de la litière et de l'humus à la dose de 3,5 à 7,5 kg de conidiospores par hectare, a réduit considérablement le nombre de mouches dans le sol (le taux de mortalité pouvait atteindre 42 %) selon le degré d'humidité du sol (Fogal, 1986). Des expériences similaires visant la répression de la pyrale des cônes du mélèze et de la mouche granivore du mélèze, à l'aide de doses de 20 kg de conidiospores par hectare d'une préparation contenant $1,8 \times 10^6$ conidiospores par gramme, ont produit un taux de mortalité de 48 % (Tyul'panova et al., 1975). On peut accroître l'efficacité des traitements en augmentant les doses, ou la virulence et le pouvoir pathogène de la préparation de spores.

La méthode décrite ici permet de produire suffisamment de conidiospores de la qualité désirée pour des études en laboratoire et des essais de petite échelle sur le terrain visant à lutter contre les insectes qui s'attaquent aux cônes et aux semences de l'épinette blanche, de l'épinette noire et d'autres essences d'arbres. Pour des essais à plus grande échelle sur le terrain, on peut obtenir dans le commerce de plus grandes quantités de conidiospores, mais leur efficacité contre ces insectes n'est pas éprouvée. On peut évaluer la qualité de ces préparations commerciales de spores en suivant les règles et les directives contenues dans le présent rapport. Les doses à appliquer peuvent ensuite être modifiées par comparaison avec des préparations à base de conidiospores de qualité connue.

RÉFÉRENCES

Barron, G.L. 1968. The genera of Hyphomycetes from soil. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.

Bartlett, K.A.; LeFebvre, C.L. 1934. Field experiments with Beauveria bassiana, a fungus attacking the European corn borer. J. Econ. Entomol. 27: 1147-1157.

Bell, J.V.; Hamalle, R.J. 1970. Three fungi tested for control of the cowpea curculio, Chalcodermus aeneus. J. Invert. Pathol. 15: 447-450.

Burgerjon, A. 1956. Pulvérisation et poudrage au laboratoire par des préparations pathogènes insecticides. An. Epiphyt. (Paris) 4: 677-686.

Champlin, F.R.; Cheung, P.Y.K.; Pekrul, S.; Smith, R.J.; Burton, R.L.; Grula, E.A. 1981. Virulence of Beauveria bassiana mutants for the pecan weevil. J. Econ. Entomol. 74: 617-621.

Clark, R.A.; Casagrande, R.A.; Wallace, D.B. 1982. Influence of pesticides on Beauveria bassiana, a pathogen of the Colorado potato beetle. Environ. Entomol. 11: 67-70.

Clerk, G.C.; Madelin, M.F. 1965. The longevity of conidia of three insect-parasitizing Hyphomycetes. Trans. Br. Mycol. Soc. 48: 193-209.

Coppel, H.C.; Mertins, J.W. 1977. Biological insect pest suppression. Springer-Verlag. New York.

Doberski, J.W. 1981. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle Scolytus scolytus: pathogenicity of Beauveria bassiana, Metarrhizium anisopliae and Paecilomyces farinosus to larvae and adults of S. scolytus. J. Invertebr. Pathol. 37: 188-194.

Doberski, J.W.; Tribe, H.T. 1980. Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae. Trans. Br. Mycol. Soc. 74: 95-100.

Dunn, P.H.; Mechalas, B.J. 1963. The potential of Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemen as a microbial insecticide. J. Insect Pathol. 5: 451-459.

Fargues, J.; Robert, P.H. 1978. Pathologie des invertébrés. - Adaptabilité de deux pathotypes de Metarrhizium anisopliae (Metch.) Sor. (Fungi Imperfecti, Hyphomycète) par culture sur milieu artificiel et par passage sur l'insecte-hôte d'origine. C.R. Acad. Sc. Paris. Série D 287: 165-167.

Finney, D.J. 1971. Probit analysis. 3rd ed., Cambridge Univ. Press. London and New York.

Fogal, W.H. In press. Applying Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. to soil for control of the spruce cone maggot Lasiomma anthracina (Czerny). In

Proc., IUFRO Cone and Seed Insects Work. Party Conf. Briançon, France, Sept. 3-5, 1986.

Fogal, W.H.; Lopushanski, S.M. 1984. Stem injection of insecticides for control of white spruce seed and cone insects. Pages 157-167 in Proc., IUFRO Cone and Seed Insects Work. Party Conf. Athens, Georgia, July 31-Aug. 3, 1983.

Fogal, W.H.; Lopushanski, S.M. 1985. A test of foliar-applied systemic insecticides to prevent damage to white spruce cones by insects. For. Chron. 61: 499-502.

Fogal, W.H.; Thurston, G.S.; Chant, G.D. 1986. Reducing seed losses to insects by treating white spruce conelets with conidiospores of Beauveria bassiana. Proc. Entomol. Soc. Ont. 117: 95-98.

Franz, J.M. 1970. Biological and integrated control of pest organisms in forestry. Unasylva 24(4): 37-46.

Franz, J.M. 1971. Biological and integrated control of pest organisms in forestry. Unasylva 25(1): 45-56.

Hall, I.M. 1954. Studies of microorganisms pathogenic to the sod webworm. Hilgardia 22: 535-565.

Hedlin, A.F. 1973. Spruce cone insects in British Columbia and their control. Can. Entomol. 105: 113-122.

Hedlin, A.F.; Yates, H.O.; Tovar, D.C.; Ebel, B.H.; Koerber, T.W.; Merkel, E.P. 1980. Cone and seed insects of North American conifers. Environ. Can., Can. For. Serv./USDA Forest Serv./Sec. Agric. Recur. Hidraul., Mexico.

Heimpel, D.M. 1971. Safety of insect pathogens for man and vertebrates. Pages 469-489 in Burges, H.D.; Hussey, N.W. eds. Microbial control of insects and mites. Academic Press, New York and London.

Johnston, A.; Booth, C. eds. 1983. Plant pathologists pocketbook. 2nd Ed. Commonwealth Agricultural Bureau, Slough, England.

Jong, S.C. 1981. Isolation, cultivation and maintenance of conidial fungi. Pages 551-575 in Cole, G.T.; Kendrick, B. eds. Biology of conidial fungi. Vol. 2. Academic Press. New York and London.

Kendrick, W.B. ed. 1971. Taxonomy of Fungi Imperfecti. University of Toronto Press. Toronto.

Kendrick, W.B.; Carmichael, J.W. 1973. Hyphomycetes. Pages 323-509 in Ainsworth, G.C. et al. eds. The Fungi. Vol. 4A. Academic Press. New York and London.

Kral, J.; Neubauer, S. 1956. Pociziti entomofytnich hub radu Beauveria proti mandolince bramborove. II. Zool. Listy. 5: 178-186.

Latch, G.C.M.; Falloon, R.E. 1976. Studies on the use of Metarhizium anisopliae to control Oryctes rhinoceros. Entomophaga 21: 39-48.

MacLeod, D.M. 1954. Investigations on the genera Beauveria Vuill. and Tritirachium Limbe. Can. J. Bot. 32: 818-890.

MacLeod, D.M.; Heimpel, A.M. 1955. Fungal and bacterial pathogens of the larch sawfly. Can. Entomol. 87: 128-131.

McCoy, E.E.; Carver, C.W. 1941. A method for obtaining spores of the fungus Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. in quantity. J.N.Y. Entomol. Soc. 49: 205.

Morris, O.N.; Cunningham, J.C.; Finney-Crawley, J.R.; Jaques, R.P.; Kinoshita, G. 1986. Microbial insecticides in Canada. Their registration and use in agriculture, forestry, and public and animal health. Sci. Policy Comm., Entomol. Soc. Can.

Müller-Kögler, E. 1967a. On mass cultivation, determination of effectiveness and standardization of insect pathogenic fungi. In van der Laan, P.A. ed. Insect pathology and microbial control. Pages 339-353. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

Müller-Kögler, E. 1967b. Side effects of insect-pathogen fungi on human beings and vertebrates. Entomophaga 12: 429-441.

Neilson, M.M.; Morris, R.F. 1964. The regulation of European spruce sawfly numbers in the Maritime Provinces of Canada from 1937 to 1963. Can. Entomol. 96: 773-784.

Pristavko, W.P.; Goral, V.M. 1967. The mass production of Beauveria bassiana. In van der Laan, P.A. ed. Insect pathology and microbial control. Pages 118-119. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

Roberts, D.W. 1973. Means for insect regulation: Fungi. An. N.Y. Acad. Sci. 217: 76-84.

Roberts, D.W.; Yendol, W.G. 1971. Use of fungi for microbial control of insects. Pages 125-140 in Burges, H.D.; Hussey, N.W. eds. Microbial control of insects and mites. Academic Press. New York and London.

Roberts, D.W.; Humber, R.A. 1981. Entomogenous fungi. Pages 201-236 in Cole, G.T.; Kendrick, B. eds. Biology of Conidial Fungi. Vol. 2. Academic Press. New York and London.

Robertson, J.L.; Russell, R.M.; Savin, N.E. 1980. Polo: A user's guide to Probit Or Logit analysis. USDA Forest Service, General Technical Report PSW-38.

Samsinakova, A.; Kalalova, S.; Vlcek, V.; Kybal, J. 1981. Mass production of Beauveria bassiana for regulation of Leptinotarsa decemlineata populations. J. Invertebr. Pathol. 38: 169-174.

Steinhaus, E.A.; Bell, C.R. 1953. The effect of certain microorganisms and antibiotics on stored-grain insects. J. Econ. Entomol. 46: 582-598.

Sterner, T.; Davidson, A.G. 1983. Forest insect and disease conditions in 1982. Forest Insect and Disease Survey., Can. For. Serv. Ottawa.

Timonin, M.I. 1939. Pathogenicity of Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. on Colorado potato beetle larvae. Can. J. Res., Sect. D. Zool. Sci. 17: 103-107.

Timonin, M.I.; Fogal, W.H.; Lopushanski, S.M. 1980. Possibility of using white and green muscardine fungi for control of cone and seed insect pests. Can. Entomol. 112: 849-854.

Tripp, H.A.; Hedlin, A.F. 1956. An ecological study and damage appraisal of white spruce cone insects. For. Chron. 32: 400-410.

Tyul'panova, V.A.; Gukasayan, A.B.; Tyul'panova, V.G. 1975. The prospects of utilizing muscardine fungi for controlling the pests of larch seeds. Lesovedenie 2: 47-52. Translated from Russian. Environment Canada. 1976.

Veen, K.H.; Ferron, P. 1966. A selective medium for the isolation of Beauveria tenella and of Metarrhizium anisopliae. J. Invertebr. Pathol. 8: 268-269.

Walstad, J.D.; Anderson, R.F. 1971. Effectiveness of Beauveria bassiana and Metarrhizium anisopliae as control agents for the pales weevil. J. Econ. Entomol. 64: 322-323.

Werner, R.A. 1964. White spruce seed loss caused by insects in interior Alaska. Can. Entomol. 96: 1462-1464.

York, G.T. 1958. Field tests with the fungus Beauveria sp. for control of the Europen corn borer. Iowa State J. Sci. 33: 123-129.

Zacharuk, R.Y.; Tinline, R.D. 1968. Pathogenicity of Metarrhizium anisopliae, and other fungi, for five elaterids (Colepotera) in Saskatchewan. J. Invertebr. Pathol. 12: 294-309.

REMERCIEMENTS

Le contenu du présent rapport est fondé en partie sur l'expérience pratique acquise par M. G.S. Thurston, qui a produit des spores sous la surveillance des D^{rs} M.I. Timonin and W.I. Illman du Département de biologie de l'Université Carleton, à Ottawa, en Ontario. Les travaux de M. Thurston ont été financés en partie par des fonds affectés à une étude sur la répression des insectes s'attaquant aux cônes et aux semences menée à l'Institut forestier national de Petawawa. Le Comité consultatif des pesticides du ministère de l'Environnement de l'Ontario a également participé au financement des travaux. Ces derniers fonds ont été administrés par G.L.(N) Farm and Forest

Research Ltd., d'Oakville, en Ontario. Une ébauche antérieure de ce rapport a été révisée par le Dr O.N. Morris de la station de recherches d'Agriculture Canada à Winnipeg, au Manitoba, le Dr H.S. Whitney du Service canadien des forêts, Agriculture Canada, à Victoria, en Colombie-Britannique, et le Dr R.Y. Zacharuk de l'Université de Regina, en Saskatchewan.

ANNEXE I

Insectes qui ont été combattus de façon appréciable en laboratoire et au cours d'expériences sur le terrain par Beauveria bassiana (Bals.) Vuill., ou Metarrhizium anisopliae (Metch.) Sor., ou les deux

Ordre	Famille	Nom scientifique	Nom vernaculaire	Références
Hémiptères	Miridés	Lygus hesperus Knight	Punaise occidentale	Dunn et Mechalas, 1963
Coléoptères	Chrysomélidés	Leptinotarsa decemlineata (Say)	Doryphore de la pomme de terre	Clark et al., 1982 Kral et Neubauer, 1956 Timonin, 1939
	Curculionidés	Chalcodermus aeneus Boheman	Charançon du dolique de Chine	Bell et Hamalle, 1970
		Curculio caryae (Horn)	Charançon des noisettes	Champlin et al., 1981
		Hylobius pales (Herbst)	Charançon du pin	Walstad et Anderson, 1971
		Sitona lineatus (Linnaeus)	Charançon rayé du pois	Müller-Kögler, 1967a
	Élatéridés	Ctenicera aeripennis (Kirby)	Vers fil-de-fer	Zacharuk et Tinline, 1968
		C. destructor (Brown)	"	" "
		Hypolithus abbreviatus (Say)	"	" "
		H. bicolor (Eschscholtz)	"	" "
		Limonius californicus (Mannerheim)	"	" "
	Scarabéidés	Oryctes nasicornis Linnaeus	Rhinocéros	Müller-Kögler, 1967
		Oryctes rhinoceros Linnaeus	Orycte du cocotier	Latch et Falloon, 1967
Lépidoptères	Pyralidés	Dioryctria abietella Schiff	Pyrale des cônes du mélèze	Tyul'panova et al., 1975
		Ostrinia nubilalis (Hubner)	Pyrale du maïs	Bartlett et LeFebvre, 1934; York, 1958
Hyménoptères	Tenthrédinidés	Pristiphora erichsonii (Hartig)	Tenthrède du mélèze	MacLeod et Heimpel, 1955
Diptères	Anthomyiidés	Chortophila laricicola Karl.	Mouche du mélèze	Tyul'panova et al., 1975
		Lasiomma anthracina (Czerny)	Mouche granivore de l'épinette	Fogal, 1986

ANNEXE II

Fournitures et équipements nécessaires à la production de conidiospores de Beauveria bassiana sur du son dans des conditions de stérilité.

1. Autoclave
2. Incubateur
3. Hotte stérile
4. Four de séchage
5. Réfrigérateur
6. Ballons de Fernbach de 2800 mL
7. Tamis (mailles de 1,0, 0,5 ou 0,044 mm de diamètre)
8. Bac destiné à recevoir les tamis
9. Agitateur à mouvement de va-et-vient pour le tamisage
10. Boîtes de Petri stériles (diamètre de 9 cm)
11. Flacons à dilution à bouchon vissable (150 mL)
12. Bacs en métal ou en verre (des bacs de 25 x 41 cm conviennent)
13. Bec Bunsen ou bec à alcool
14. Anse d'inoculation
15. Anse en fil métallique rigide (longue goupille en fil métallique torsadé)
16. Pipettes stériles (1 mL dans 1/100 mL; 10 mL dans 1/10 mL)
17. Coton non absorbant
18. Milieux de culture gélose-pommes de terre-dextrose (GPD)
19. Son provenant de blé non traité
20. Tween 80
21. Microscope de dissection à faible grossissement (50 - 100X)
22. Microscope à fort grossissement (150 - 1500X)
23. Lames porte-objet et lamelles couvre-objet pour microscopes
24. Hémacytomètre
25. Eau distillé

ANNEXE III

Recette pour la production d'un milieu d'isolement sélectif pour Beauveria bassiana et Metarrhizium anisopliae.

Mélanger les ingrédients suivants et stériliser à l'autoclave à 121°C (103,5 kPa) pendant 20 minutes.

glucose	40 g
néopeptone (Difco)	10 g
gélose	15 g
Crystal violet	0,01 g
chloramphénicol	0,5 g
eau distillée	jusqu'à 975 mL

Une solution de cycloheximide (10 mg/mL) est stérilisée à l'autoclave séparément, et 25 mL sont ajoutés au reste du milieu quand celui-ci et la quantité à ajouter sont refroidis, mais avant que la gélose se transforme en gel.